

بررسی فراوانی ژن های فیمبریه *papA* *fimH* *kpsMT* *papEF* و *ibeA* در نمونه های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت ادراری کودکان

مونا صالحی، کیومرث امینی*

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: سویه های اشریشیاکلی عامل مهمی در بروز عفونت ادراری بوده و به گروه اشریشیاکلی بیماری زای خارج گوارشی تعلق دارند. اشریشیاکلی یوروباتوزنیک فاکتورهای حدت مختلفی را بروز می دهند. این فاکتورها در ایجاد کلونیزاسیون، تهاجم و متعاقب آن کاهش پاسخ دستگاه ایمنی میزبان می شوند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های حدت *papAH* *fimH* *kpsMT* *papEF* و *ibeA* از جدایه های اشریشیاکلی ایزوله شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آن بود.

روش بررسی: در مجموع ۶۰ جدایه اشریشیاکلی از نمونه های ادراری اخذ گردید. جدایه ها بر اساس تست های بیوشیمیایی و باکتریولوژی استاندارد تشخیص داده شدند. جدایه های تأیید شده به منظور تعیین ژن های *papAH* *fimH* *kpsMT* *papEF* و *ibeA* توسط روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها علیه ۹ عامل ضد میکروبی صورت گرفت.

یافته ها: ژن حدت *fimH* دارای بیشترین فراوانی (۷۵٪) بود. سایر ژن ها شامل *papEF* *kpsMT* و *papAH* به ترتیب در ۲۱/۶٪، ۱۱/۶٪ و ۱۰٪ جدایه ها شناسایی شدند. بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین و آمپی سیلین به ترتیب با ۹۶/۳٪ و ۸۷/۲٪ فراوانی و بیشترین میزان حساسیت به آنتی بیوتیک کوآموکسی کلاو با ۹۴/۶٪ فراوانی گزارش شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد ژن *fimH* دارای بیشترین فراوانی در بین سویه های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت ادراری مربوط به کودکان می باشد و عامل مهمی در بیماری زایی این باکتری می باشد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، ژن های حدت، عفونت مجاری ادراری.

مقدمه:

عفونت های ادراری می باشند (۳). باکتری اشریشیاکلی یکی از مهم ترین عوامل عفونت خارج روده ای است. این باکتری سبب بیماری هایی مانند عفونت ادراری، پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، سپتی سمی و عفونت بافت های نرم می شود. عفونت های حاصله از این باکتری، یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر می باشد (۴). اشریشیاکلی یوروباتوزن، دارای فاکتورهای ویروالانس متعددی می باشد که جهت پایداری و کلونیزاسیون این باکتری در مجاری ادراری ضروری می باشد. این فاکتورهای حدت

عفونت مجاری ادراری شایع ترین عفونت اکتسابی از جامعه و بیمارستان در بین افراد است (۱). در ایالات متحده آمریکا هر ساله ۱/۶ میلیون دلار هزینه صرف درمان این عفونت ها تخمین زده می شود و ۴۰-۵۰٪ زنان سالم بالغ در طول دوره زندگی خود حداقل یک بار عفونت مجاری ادراری را تجربه کرده اند (۲). اگرچه چندین نوع میکروارگانیزم شامل قارچ ها، ویروس ها و باکتری ها می توانند باعث عفونت های ادراری شوند، ولی باکتری ها از مهم ترین و شایع ترین عوامل ایجاد کننده

عبارتند از عوامل اتصال، توکسین ها، سیدروفورها و کپسول های پلی ساکاریدی (۵). در بین عوامل حدت، اتصال یکی از عوامل مهم دخیل در بیماری زایی این باکتری می باشد. از مهم ترین عوامل اتصال عبارتند از فیمبریه نوع ۱، فیمبریه نوع P، عوامل غیر فیمبریه ای و تاژک. اتصال /شریشیاکلی به سلول های یوروپای تلیال مجاری ادراری، توسط لیگاند های باکتری به رستپور سلول میزبان صورت می گیرد. این اتصال سبب می شود این باکتری با وجود عوامل مکانیکی مانند جریان ادرار در مجاری ادرار باقی بماند. سویه *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) عوامل متعدد فیمبریه ای جهت این اتصال هستند. فیمبریه نوع ۱ یا فیمبریه حساس به مانوز به صورت ارگانل های فیلامنتی سطوح باکتری ها را می پوشاند و تمایل بالایی به رستپورهای سلول های مجاری ادراری دارند و اتصال آن نقش مهمی در کلونیزاسیون این باکتری دارد (۶). این فیمبریه توسط دسته ژنی *fim* کد می شود. پروتئین *fimH* در نوک فیمبریه قرار دارد و به طور مستقیم به گلیکوپروتئین های سلول های خونی و اپی تلیال متصل می شود. این فیمبریه معمولاً بیشترین فاکتورهای حدت را در بین /شریشیاکلی های یوروپاتوژنیک دارد و در بیش از ۹۰-۸۰٪ از باکتری /شریشیاکلی عرضه می شود (۷). فیمبریه نوع P یا فیمبریه مرتبط با پیلونفریت، یکی از فیمبریه های مقاوم به مانوز است و بعد از فیمبریه تیپ ۱ معمول ترین فیمبریه در سویه های ایجاد کننده عفونت ادراری به شمار می آید. این پیلی بیشتر از ۸۰٪ ایزوله های جدا شده از پیلونفریت را شامل می شود (۸). فیمبریه نوع P کلونیزاسیون باکتری را در مراحل اولیه عفونت سرعت بخشیده و با تکثیر در اپی تلیوم مجاری ادراری منجر به ایسکمی و ارتشاح سلول های ایمنی می گردد (۹). پیلی P توسط دستجات ژنی *pap* که متشکل از زیر واحدهای *papA*، *papG*، *papF*، *papE* و *papC* می باشد، ایجاد می شود (۸). از دیگر عوامل حدت UPEC کپسول می باشد. در میان سویه های /شریشیاکلی

پاتوژنیک خارج روده ای کپسول به صورت نازک، منقطع، اسیدی و مقاوم به حرارت است. کپسول دارای چندین نقش می باشد، از جمله مقاومت در برابر فاگوسیتوز، مقاومت به کشندگی سرم و از فاکتورهای موثر در اتصال و تشکیل بیوفیلم. ژن های متعددی در تشکیل کپسول نقش دارند که ژن های *kps* هستند (۱۰). یکی از عوامل حدت این باکتری قدرت تهاجم آن است که سبب گسترش این عفونت می شود. *ibea* یک عامل مربوط به تهاجم می باشد که قادر به حمله به جریان خون در حین عفونت ادراری است و می تواند از سد خونی مغزی عبور کند (۱۱). در عفونت های ساده ادراری معمولاً درمان تجربی بدون استفاده از کشت و آنالیز حساسیت آنتی بیوتیکی پیشنهاد می شود. طی چند دهه اخیر، به دنبال افزایش مقاومت ضد میکروبی در سویه های مختلف باکتری، آمارهای جهانی نشان می دهد مقاومت دارویی در بین سویه های */شریشیاکلی* یوروپاتوزن نیز این افزایش را داشته است. این مقاومت منجر به استفاده از آنتی بیوتیک های جدیدتر و قوی تر می شود. بررسی این مقاومت ها جهت شناسایی اهمیت این مشکل و پیدا کردن راهکار درمانی مناسب ضروری می باشد (۴). هدف از انجام این تحقیق شناسایی ژن های *papA*، *fimH*، *kpsMT* و *papEF* و *ibea* */شریشیاکلی* از منابع عفونت ادراری کودکان با روش Multiplex-PCR و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی این جدانه ها می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه که در قالب یک طرح توصیفی مقطعی انجام شد، تعداد ۱۰۰ نمونه ادرار از کودکان بیمار مبتلا به عفونت های ادراری از تعدادی از آزمایشگاه های تشخیص طبی خصوصی گردآوری گردید و به آزمایشگاه گروه میکروب شناسی منتقل شد. نمونه ها ابتدا در محیط مک کانکی و آگار خوندار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون

Taq polymerase با غلظت ۲/۵ واحد به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. برنامه حرارتی جهت انجام واکنش های PCR عبارت بود از واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل هر کدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، امتداد در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و نیز امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردیدند؛ سپس به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شدند. آنتی بیوگرام برای جدایه های /شریشیالکی از طریق روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer 1996). بر اساس راهنمای استاندارد CSLI انجام شد (۱۲). در این آزمایش حساسیت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم (CTX، ۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (GM، ۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (TE، ۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم سولفومتا -کسازول (SXT، ۲۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (AM، ۲۵ میکروگرم)، کوآموکسی کلاو (AMC، ۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (AN، ۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (CP، ۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین (P، ۱۰ میکروگرم)، سنجیده شد.

کلونی های لاکتوز مثبت از محیط مک کانکی به محیط EMB منتقل شد و باکتری ها توسط تست های بیوشیمیایی (IMViC) برای شناسایی /شریشیالکی مورد بررسی قرار گرفت که در صورت مثبت بودن ۲ تست اول (ایندول و متیل رد) و منفی بودن ۲ تست دوم (ووژپرسکائر و سیترات) تأیید قطعی صورت گرفت. پس از کشت های اولیه به منظور بالا بردن دقت از تست های بیوشیمیایی مانند مصرف سیترات، TSI، MR/VP، SIM، اوره و نیترات استفاده شد. استخراج DNA از باکتری ها، با استفاده از کیت استخراج DNA (مرکز ذخایر ژنتیک) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. جهت شناسایی عوامل فیمبریه ایی باکتری /شریشیالکی یوروپاتوژن به عنوان متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه ژن های فیمبریه *papA*، *fimH*، *kpsMT*، *papEF* و *ibeA* در این نمونه های تأیید شده مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش از روش Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (جدول شماره ۱) (۱۱). در این پژوهش واکنش زنجیرهای پلیمرز PCR استاندارد در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر 1X PCR buffer، ۱ میکرولیتر ۱/۵MgCl₂ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTP mix ۵ میلی مولار، پرایمرهای مورد استفاده با غلظت ۰/۵ میکرومول هر کدام ۰/۸ میکرولیتر، آنزیم

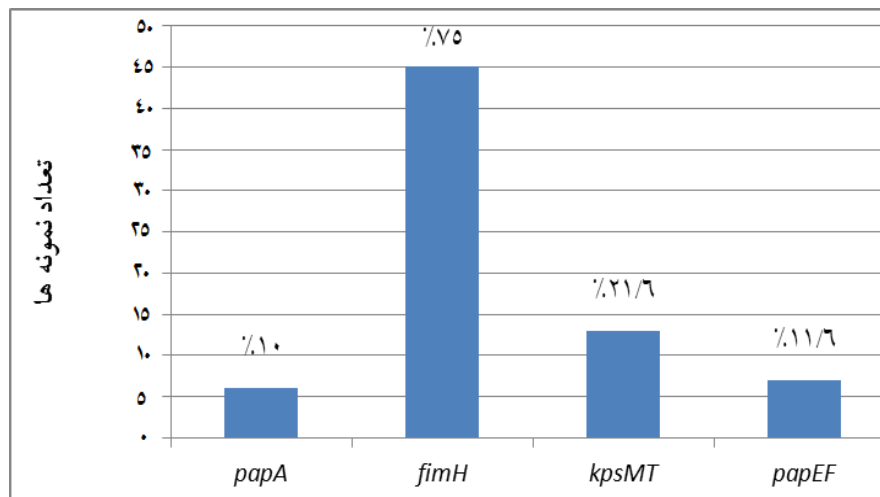
جدول شماره ۱: آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر	توالی پرایمر (5' به 3')	اندازه محصول (bp)	سویه استاندارد
<i>papAH</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	۷۲۰	A30
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGTA	۵۰۸	J96
<i>kpsMT</i>	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT AGGCGTATCCATCCCCTCCTAAC	۳۹۲	J96
<i>papEF</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	۳۳۶	J96
<i>ibeA</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	۱۷۰	J96

یافته ها:

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری، ۶۰ نمونه با استفاده از آزمایشات کشت و بیوشیمیایی به عنوان اشریشیاکلی شناسایی و تأیید شد. نتایج آزمایش Multiplex-PCR جهت شناسایی ژن های فیمبریه ای نشان داد که از

۶۰ جدایه مورد مطالعه، ۷ جدایه (۱۱/۶٪) دارای ژن *papEF* ۱۳ جدایه (۲۱/۶٪) دارای ژن *kpsMT* ۴۵ جدایه (۷۵٪) دارای ژن *fimH* و ۶ جدایه (۱۰٪) دارای ژن های *papA* بودند. در هیچ یک از نمونه ها ژن *ibeA* شناسایی نگردید (نمودار شماره ۱) (تصویر شماره ۱).



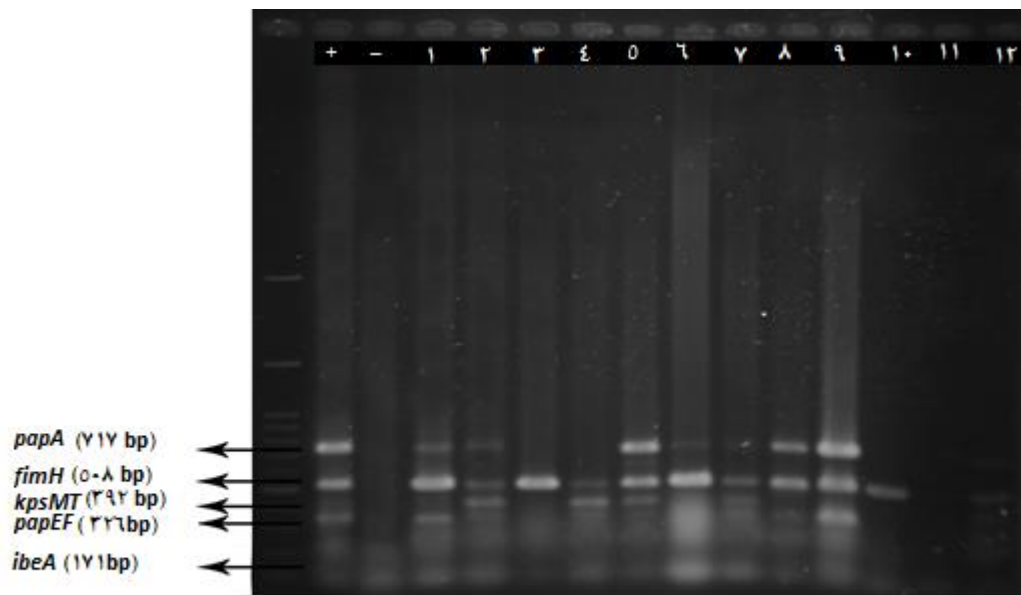
نمودار شماره ۱: نمودار فراوانی ژن های حدت /اشریشیاکلی یورپاتوژن بر حسب تعداد و درصد

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی برای تمامی ۶۰ ایزوله /اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری نشان داد بیشترین درصد مقاومت مربوط به

آنتی بیوتیک های پنی سیلین با ۹۶٪ و آمپی سیلین با ۸۷/۲٪ و کمترین درصد مقاومت مربوط به آمیکاسین ۷/۳٪ بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: میزان حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اشریشیاکلی جداسازی شده

آنتی بیوتیک	حساس (تعداد، درصد)	حساسیت متوسط (تعداد، درصد)	مقاوم (تعداد، درصد)
سفوناکسیم	۷ (۱۲/۸٪)	۶ (۱۰/۹٪)	۴۲ (۷۶/۳٪)
کوآموکسی کلاو	۵۲ (۹۴/۶٪)	۳ (۵/۴٪)	—
آمیکاسین	۴ (۷/۳٪)	۴۷ (۸۵/۴٪)	۴ (۷/۳٪)
تتراسایکلین	۱۳ (۲۳/۶٪)	۴ (۷/۳٪)	۳۸ (۶۹/۱٪)
کوتریموکسازول	۹ (۱۶/۳٪)	۷ (۱۲/۷٪)	۳۹ (۷۱٪)
آمپی سیلین	—	۷ (۱۲/۸٪)	۴۸ (۸۷/۲٪)
سیپروفلوکساسین	۳۷ (۶۷/۲٪)	۲ (۳/۷٪)	۱۶ (۲۹/۱٪)
پنی سیلین	—	۲ (۳/۷٪)	۵۳ (۹۶/۳٪)
جنتامایسین	۰	۲۵ (۴۵/۴٪)	۳۰ (۵۴/۶٪)



تصویر شماره ۱: نتیجه آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه ها به ترتیب از چپ به راست: مارکر bp ۱۰۰، کنترل مثبت (شریشیاکلی سویه J96)، کنترل منفی، چاهک ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ واجد ژن *fimH*، چاهک شماره ۱، ۵، ۸ و ۹ دارای ژن *papA* جدایه ۱ مثبت از نظر ژن *papEF*

بحث:

گسترش عفونت دارند. از این رو در مطالعات مختلف فاکتورهای ویروالانس باکتری/شریشیاکلی در جدایه های مربوط به عفونت های ادراری، در ایران و نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفته اند. در مطالعه ناظمی و همکاران شیوع ژن های *fim* و *pap* در نمونه های/شریشیاکلی یوروپاتوژن مورد بررسی قرار گرفت و میزان شیوع این ۲ ژن به ترتیب ۹۴٪ و ۳۵/۵٪ گزارش شد (۲). عربی و همکاران به بررسی حضور تعدادی از ژن های فیمبریه ای در ۳۴۳ نمونه/شریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری جمع آوری شده از آزمایشگاه های تشخیص طبی پرداختند. در این مطالعه میزان شیوع ژن های *fimH* و *pap* ۸۷/۷ و ۳۰٪ بود (۱۵). کریمیان و همکاران به بررسی حضور ژن های ویروالانس در ۱۲۳ نمونه/شریشیاکلی جداسازی شده از

شریشیاکلی به عنوان یکی از مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های ادراری در انسان محسوب می گردد. این باکتری قادر به ایجاد عفونت های ادراری وسیعی از سیستم تا پیلونفریت می باشد. شدت عفونت بستگی به حدت سویه و مقاومت میزبان دارد. شناسایی فاکتورهای ویروالانس این باکتری در پیشگویی وضعیت عفونت موثر می باشد. بسیاری از این عوامل حدت محصول ژن های مختلفی می باشند که قابل شناسایی هستند. از این رو مطالعات مولکولی متعددی در جهت شناسایی این عوامل حدت صورت گرفته است (۱۴، ۱۳). در بین عوامل حدت در سویه های بیماری زای/شریشیاکلی از موارد عفونت های ادراری فیمبریه ها نظیر فیمبریه P و *fimH* از اهمیت ویژه ای برخوردارند. علاوه بر عوامل فیمبریه ای کپسول و عامل تهاجم نیز نقش مهمی در

عفونت های ادراری پرداختند. در این مطالعه، فراوانی ژن *fimH* ۶۹/۶٪ و فراوانی ژن *pap* ۵۰/۴٪ بود (۱۶). بهالو و همکاران، از ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی یوروپاتوژن، فراوانی ژن های *fimH* و *pap* به ترتیب ۳۰٪ و ۴۰٪ گزارش کردند (۱۷). جلالی و همکاران، ۱۰۰ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری را از لحاظ وجود تعدادی از ژن های حدت مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه هم میزان شیوع ژن های *fimH* و *pap* ۷۳٪ و ۴۶٪ بود (۱۳). در مطالعه حجتی و همکاران، میزان شیوع ژن *fimH* ۹۲/۸٪ بود (۶). در مطالعه علیزاده و همکاران، فراوانی ژن *papEF* در بین سویه های یوروپاتوژن ۱۰٪ بود (۱۸). ممتاز و همکاران به بررسی حضور ژن های ویروالانس و مقاومت دارویی در سویه های اشریشیاکلی پرداختند. ۸۶٪ سویه ها واجد ژن *fim* ۴٪ نمونه ها دارای ژن *kpsMT* بودند (۱۹). درخشنده و همکاران میزان فراوانی ژن *ibeA* را در جدایه های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری ۹/۴٪ به دست آوردند (۲۰). اسدی و همکاران به بررسی حضور تعدادی از ژن های ویروالانس در جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن و سنجش میزان حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها پرداخته و گزارش نمودند که ۵۶/۷٪ جدایه های دارای ژن *fimH* و ۲۰٪ واجد ژن *ibeA* می باشند (۴). Johnson و همکاران به بررسی حضور ۲۹ ژن ویروالانس در ۷۵ سویه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری پرداختند. در این مطالعه فراوانی ژن *fimH* ۱۰۰٪، *papAH* ۷۹٪، *papEF* ۷۷٪، *kpsMT* ۱٪، *ibeA* ۵٪ بود (۱۱). در مطالعه Robino و همکاران، میزان فراوانی ژن های *fimH*، *kpsMT* و *papEF* به ترتیب ۸۹٪، ۸۷٪ و ۸۸٪ بوده است (۲۱). در مطالعه Tiba و همکاران، میزان شیوع ژن های *fimH* ۹۷/۵٪، *kpsMT* ۵۳/۱٪ و *papEF* ۳۲/۷٪ بود. (۵). در مطالعه Watts و همکاران، میزان شیوع ژن های *fimH* و *kpsMT* در بین جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن ۹۸٪ و ۳٪ بوده است (۲۲). Tramuta و همکاران به بررسی شیوع ژن های فیمبریه ای در

سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن جداسازی شده از سگ و گربه در کشور ایتالیا پرداختند. در این مطالعه ژن *fim* دارای بالاترین فراوانی (۸۳٪) در سگ ها و ۹۰٪ در گربه ها) در بین این سویه ها بود (۲۳).

در مطالعه حاضر فراوانی ژن های فیمبریه ای از جمله *fimH*، *papEF* و *papAH* به ترتیب برابر با ۷۵٪، ۱۱/۶٪ و ۱۰٪ بود. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان می دهد که فراوانی ژن *fimH* در مقایسه با سایر ژن های فیمبریه ای دخیل در ایجاد عفونت های ادراری به مراتب بیشتر بوده و سایر ژن های فیمبریه ای در مرتبه های بعدی قرار می گیرند که این امر نشان دهنده اهمیت بالای این ژن فیمبریه در بروز بیماری و بیماری زایی این باکتری متناسب با علائم بالینی در نمونه های جمع آوری شده این تحقیق می باشد که این امر می تواند با میزان شیوع ژن ها و باکتری اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری ارتباط داشته باشد. در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن کپسولی ۲۱/۶٪ بود که از لحاظ فراوانی به عنوان دومین ژن حدت شناخته شده است که در ایجاد بیماری دخیل می باشد. در مطالعات مختلف درصد های متفاوتی از شیوع میزان این ژن به دست آمد که علت این تفاوت می تواند تفاوت در منبع سویه ها یا تفاوت در منطقه جغرافیایی باشد. همان طور که از نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات به دست آمد، میزان فراوانی ژن *ibeA* کمتر از سایر ژن هاست و در مطالعه حاضر نیز در هیچ یک از جدایه ها این ژن شناسایی نشد. از مزایای مطالعه حاضر، استفاده از روش Multiplex-PCR بود که امکان شناسایی همزمان چند ژن ویروالانس را به طور همزمان و در مدت زمان کوتاه تر امکان پذیر می سازد.

مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها به ۲ صورت ذاتی و اکتسابی می باشد. در مقاومت ذاتی سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی بیوتیک ها بوده، درحالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و سویه های حساس به مقاوم ناشی می شود. موضوع بروز و شیوع

اول در درمان عفونت های ادراری غیر پیچیده هستند، اما با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر و مقاومت بالای این سویه ها به این آنتی بیوتیک ها، پیشنهاد می شود آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی قبل از درمان انجام شود. از سویی با توجه به این که فلوروکینولون ها یکی از داروهای انتخابی در درمان عفونت های ادراری هستند، مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده شده در مطالعه حاضر می تواند به عنوان یک هشدار برای گسترش مقاومت به این آنتی بیوتیک به شمار آید.

نتیجه گیری:

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که بر طبق مطالعات انجام شده و مقایسه آن با دستاوردهای این پژوهش میزان ژن *fimH* در همه جدایه ها بیشترین درصد را به خود اختصاص داده و ژن های فیمبریه *papEF kpsMT* در رتبه های بعدی قرار گرفته اند. پس این ۳ ژن جزئی از فاکتورهای حدت /شریشیکلی بوده که قادر به ایجاد عفونت ادراری می باشند. در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی راجع به پاتوتیپ های /شریشیکلی و ژن های مربوط صورت گرفته است. حال با کمک روش Multiplex-PCR می توان در کوتاه ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن های بیماری زا پی برد و درمان مناسب و به موقع را انجام داد. بدون شک با مطالعات بیشتر اهمیت هر یک از ژن های حدت در پاتوژنز /شریشیکلی در عفونت های ادراری مشخص خواهد شد که این یافته ها جهت طراحی معیارهای پیشگیری کننده نیاز است.

تشکر و قدردانی:

نگارنده کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم و دکتر علیرضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، اعلام می دارد.

مقاومت های میکروبی به خصوص مقاومت باکتری های گرم منفی یکی از موانع اساسی بر سر راه درمان قطعی بیماری های عفونی محسوب می شود (۲۴). در مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین و آمپی سیلین با ۹۶/۳٪ و ۸۷/۲٪ بود. مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها هم مشاهده گردید. بدین ترتیب که ۷۶/۳٪ به سفوتاکسیم، ۷۱٪ به کوتریموکسازول، ۶۹/۱٪ به تراسایکلین، ۵۴/۶٪ به جنتامایسین، ۲۹/۱٪ به سیپروفلوکساسین و ۷/۳٪ به آمیکاسین مقاوم بودند. در مطالعه ممتاز و همکاران میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین، تراسایکلین، کوتریموکسازول، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به ترتیب ۱۰۰٪، ۷۳/۹٪، ۳۰/۸٪، ۱۷٪، ۱۹/۵٪ و ۳۶/۵٪ بود (۱۹). در مطالعه اسدی و همکاران میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، کوتریموکسازول و جنتامایسین به ترتیب ۲۱٪، ۱۳٪، ۴۵٪ و ۱۱/۷٪ بود (۴). در مطالعه درمیش و همکاران میزان مقاومت ضد میکروبی باکتری /شریشیکلی جداسازی شده از نمونه های عفونت ادراری کودکان، بررسی شد. میزان مقاومت به جنتامایسین ۹۵/۱٪، آمپی سیلین ۹۱/۹٪، آمیکاسین ۸۵/۴٪، سیپروفلوکساسین ۸۳/۸٪، تراسایکلین ۶۲/۹٪، سفوتاکسیم ۲۲/۵٪ گزارش شد (۲۵). در مطالعه مومنی مفرد و همکاران در استان لرستان، میزان مقاومت جدایه های /شریشیکلی یورپاتوژن به آمپی سیلین ۸۹٪ (بیشترین مقاومت)، تری متوپریم سولفامتوکسازول ۷۲٪، تراسایکلین ۶۶٪، سیپروفلوکساسین ۵۵٪، جنتامایسین ۳۹٪ بود (۲۶). با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مقاومت به پنی سیلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، تراسایکلین، کوتریموکسازول و آمپی سیلین بالای ۵۰٪ است. مقاومت چند دارویی نسبت به *E. coli* در چند دهه اخیر افزایش پیدا کرده است (۲۵). در تحقیق حاضر نیز میزان مقاومت چند دارویی به ۵ دارو و بیشتر حدود ۶۰٪ گزارش شده است. طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی، آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و کوتریموکسازول به عنوان داروهای خط

منابع:

1. Kausar Y, Chunchanur SK, Nadagir SD, Halesh L, Chandrasekhar M. Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. Al Ameen J Med Sci. 2009; 2(1): 47-51 .
2. Nazemi A, Naderi M, Jafarpour M, Mirinargesi M, Sharifi S. The Detection of Fimbrial Pathogenic Genes in *E. coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. Med Lab J. 2010; 4(2): 31-7 .
3. Struelens MJ, Denis O, Rodriguez-Villalobos H. Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. Microbes Infect. 2004; 6(11): 1043-8.
4. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S. The association of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* with antibiotic resistance. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(5): e9936 .
5. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008; 50(5): 255-60.
6. Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzadeh M, Molaie R, Gholipour A. The FimH gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(2): e17520.
7. Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. Eur J Clin Invest. 2008; 38 Suppl 2: 2-11.
8. Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. Iran J Microbiol. 2010; 2(2): 59-72.
9. Serajian AA, Zaman Zad B, Afroogh P, Soltan Dallal MM. Identification of P fimbriae virulence factor in uropathogenic *Escherichia coli* by PCR in Shaherkord Hospitals. Sci J Kurdistan Univ Med Sci. 2012; 17(2): 36-43.
10. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(1): 80-128.
11. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis. 2000; 181(1): 261-72.
12. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45(4): 493-6.
13. Jalali HR, Pourbakhsh A, Fallah F, Eslami G. Genotyping of Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* by PCR. Novel Biomed. 2015; 3(4): 177-81.
14. Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. J Infect Chemother. 2007; 13(2): 68-73.
15. Arabi SH, Tohidi F, Naderi S, Nazemi A, Jafarpour M, Naghshbandi R. The common fimbaria genotype in uropathogenic *Escherichia coli*. Annals Biologi Res. 2012; 3(10): 4951-54.
16. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(39): 6811-6.
17. Bahalo S, Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Momeni M, Tajbakhsh F. Detection of some virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by multiplex PCR. Middle East J Sci Res. 2013; 14(1): 29-32.
18. Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR. Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from diarrheic and urinary tract infections in relation to phylogeny in southeast of Iran. Trop Biomed. 2014; 31(1): 174-82.
19. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013; 12: 8.
20. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi Boroojeni A, Bahadori M, Arabshahi S, et al. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. Lett Appl Microbiol. 2015; 60(2): 148-54.

21. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Pirez MC, et al. Intracellular bacteria in the pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection in children. Clin Infect Dis. 2014; 59(11): e158-64.
22. Watts RE, Hancock V, Ong CL, Vejborg RM, Mabbett AN, Totsika M, et al. *Escherichia coli* isolates causing asymptomatic bacteriuria in catheterized and noncatheterized individuals possess similar virulence properties. J Clin Microbiol. 2010; 48(7): 2449-58.
23. Tramuta C, Nucera D, Robino P, Salvarani S, Nebbia P. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. J Vet Sci. 2011; 12(1): 49-55.
24. Joklik WK, Willett HP, Amos D. Zinsser microbiology Appleton and Lange; 1988. Available from: <https://scholar.google.com>.
25. Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E, Safarpour Dehkordi F, Pilevarzadeh M. Characterization and the study the antibiotic resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. Iran J Med Microbiol. 2013; 7(2): 27-39.
26. Momeni Mofrad S, Goudarzi G, Shakib P, Nowroozi J. Prevalence of aac (3)-IIa gene among clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* in Delfan, Lorestan. Iran J Med Microbiol. 2013; 7(2): 20-6.

The frequency of fimbriae genes *papA*, *fimH*, *kpsMT*, *papEF* and *ibeA* in *Escherichia coli* isolated from children urinary tract infection

Salehi M, Amini K*

Microbiology Dept., Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. Iran.

Received: 8/Jan/2016 Accepted: 15/Mar/2016

Background and aims: *Escherichia coli* is a major cause of urinary tract infections and belongs to *E.coli* groups of gastrointestinal outside. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) appears different virulence factors. These factors create colonization, invasion and the subsequent decline in immune response of the host. The aim of this study was to evaluate the prevalence of virulence genes *fimH*, *papAH*, *papEF*, *kpsMT* and *ibeA* in *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and to determine their antibiotic susceptibility.

Methods: A total of 60 isolates of *E.coli* from urine samples were taken. The isolates were identified by standard biochemical tests and bacteriology. The verified isolates were studied to determine the genes *papA*, *fimH*, *kpsMT*, *papEF* and *ibeA* by using Multiplex- PCR methods. The antibiotic sensitivity test of isolates against 9 antimicrobial agents was taken.

Results: The *fimH* virulence gene has the highest rate (75%). Other genes were identified including *kpsMT*, *papEF* and *papAH*, respectively in 21.6%, 11.6% and 10% of isolates. The most resistance was reported to antibiotics penicillin and ampicillin, respectively 96.3% and 87.2% frequency and the highest sensitivity to antibiotics amoxicillin clavulanic acid with 94.6% frequencies.

Conclusion: The results showed that the gene *fimH* has the most frequent among *Escherichia coli* strains isolated from UTI in children, and is an important factor in virulence of the bacteria.

Key words: *Escherichia coli*, Virulence gene, Urinary tract infection.

Cite this article as: Salehi M, Amini k. The frequency of fimbriae genes *papA*, *fimH*, *kpsMT*, *papE* and *ibeA* in *Escherichia coli* isolated from children urinary tract infection. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(5): 73-82.

***Corresponding author:**

Microbiology Dept., Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. Iran.
Tel: 00989125454074, E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir